

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 199 45 765 A 1**

(51) Int. Cl. 7:

C 07 H 21/00

C 12 N 15/10

C 12 N 15/11

(66) Innere Priorität:

199 12 983. 5 22. 03. 1999

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(71) Anmelder:

Cullen, Paul, Dr., 48159 Münster, DE; Seedorf, Udo,
Priv.-Doz. Dr., 48149 Münster, DE; Lorkowski,
Stefan, 48149 Münster, DE

(74) Vertreter:

König · Palgen · Schumacher · Kluin, 40549
Düsseldorf

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Nukleinsäurekombination

(57) Eine Nukleinsäurekombination wird an eine zu mindestens einer Referenzsequenz komplementäre Nukleotidsequenz gekoppelt.

DE 199 45 765 A 1

DE 199 45 765 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäurekombination und ein Verfahren zum Hybridisieren, insbesondere zum Identifizieren von Nukleinsäuren.

Hybridisierungstechniken, d. h. die gezielte Anlagerung zweier komplementärer Nukleinsäuren aneinander, stellen einen wesentlichen Schritt in einer Vielzahl molekulärbiologischer Verfahren dar. Mit diesen Techniken werden einzelne Gene oder Teile davon in einer Präparation genetischer DNA oder das Transkriptionsprodukt eines Genes (mRNA) nachgewiesen [Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., vol. 2, 1989, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13.96-97; Constanzi C. Gillespie, D.: Fast blots: immobilization of DNA and RNA from cells. In: Guide to molecular cloning techniques. Edited by Berger, S. R. and Kimmel, A. R., Academic Press Inc., San Diego: Methods in Enzymology 1987, 152: p582-87; Schena, M. et al.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270: p467-470].

So werden Hybridisierungen beispielsweise in der Genomanalyse zur Bestimmung und Charakterisierung der Aktivität oder Veränderungen einzelner Gene oder der Untersuchungen von Mutationen eingesetzt. Ebenso können sie die Früherkennung von Krebserkrankungen, die genetische Risikoabschätzung bei Volkskrankheiten, wie beispielsweise Diabetes oder Hypertonie ermöglichen, sowie der Voraussage für die Entstehung der koronaren Herzkrankung dienen [Ausubel, F. M.; Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. E., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (Hrsg.) Current protocols in molecular biology, 1998, John Wiley & Sons].

Üblicherweise wird eine Hybridisierung mit einer Nachweisreaktion und anschließender Identifizierung einer Nukleinsäuresequenz kombiniert. Dazu wird ein Nukleinsäurestrang beispielsweise durch Farbstoffe, Radioaktivität oder chemolumineszierende oder fluoreszierende Moleküle markiert, während der zweite an einer festen Phase gebunden ist. In den häufig angewandten Southern-BLOTS für DNA-Analysen und Northern-BLOTS für RNA-Analysen wird die feste Phase meist entweder von Nitrozellulose- oder Nylonmembranen gebildet.

In diesen herkömmlichen Blot-Systemen wird genetische DNA oder RNA, die sogenannten Targetsequenzen, über ein Agarosegel elektrophoretisch getrennt, auf die Nitro- oder Nylonmembran transferiert und mit einer bekannten DNA- bzw. RNA-Sequenz als Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wird durch eine vorherige Markierung der Sonde nachgewiesen und ggf. quantifiziert. Diese Verfahren sind durch eine hohe Spezifität gekennzeichnet. Sie besitzen aber den Nachteil, daß die Durchführung eines Blotvorgangs sehr arbeits- und zeitintensiv ist, und in einem Durchgang jeweils nur wenige Sequenzen gleichzeitig untersucht werden können.

Das Hybridisieren einer Sonde mit einem Target kann neuerdings auch durch sogenannte Genchips erfolgen [Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, E. L. Expression Monitoring by Hybridization to High-Density Oligonucleotide Arrays. Nature Biotechnology. 14: 1675-1680, 1996; Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. Genome-Wide Expression Monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Biotechnology. 15: 1359-1367, 1997]. Genchips bestehen aus einem festen Träger aus beispielsweise einem Kunststoff oder Glas, auf den bis zu mehrere tausend kurze Oligonukleotide als Sonden aufgebracht

werden können. So wird die Oberfläche des nur wenige Quadratzentimeter großen Chips mit einem "Rasen" von Oligonukleotiden bedeckt, mit denen die komplementären Nukleinsäuresequenzen einer cDNA- oder RNA-Probe hybridisieren können. Diese Targetsequenzen werden zuvor markiert, um den späteren Nachweis der Hybridisierung zu erbringen.

Die Verwendung von Genchips erlaubt die Untersuchung von bis zu mehreren tausend verschiedenen Sequenzen zur gleichen Zeit und stellt gegenüber den herkömmlichen Blot-Verfahren somit eine Verbesserung dar. Weiterhin kann die Hybridisierung auf dem Chip über einen Scanner ausgewertet werden, so daß das Verfahren weitgehend automatisiert werden kann.

Für die Herstellung von Genchips sind verschiedene Techniken entwickelt worden, beispielsweise lithographische Verfahren, Siebdruck- oder Reaktionskanalverfahren, elektrochemische-/synthetische Verfahren, ink-jet-Systeme, micropin-Verfahren, open capillary tips. Auch wird die Verwendung von Microbeads beschrieben [Lackner, K. J. et al. Multiplex DNA- und RNA-Analyse an fluoreszenten Microbeads als Alternative zum DNA-Array. Statusseminar Chip-technologie für DNA-Diagnostik und Sequenzanalyse in Deutschland. DECHEMA 1999].

Die US-Patentschrift 5 837 832 offenbart ein photo-lithographisches Verfahren, bei dem das über eine definierte Maske auf einen Träger einstrahlende Licht eine auf diesem Träger aufgebrachte funktionelle Gruppe aktiviert und diese aktivierte Gruppe mit einer nukleosid-bildenden Einheit reagiert, die ihrerseits wiederum eine licht-aktivierte funktionelle Gruppe trägt. Dieser Vorgang kann beliebig wiederholt werden. In Abhängigkeit von der Gestaltung der Maske und der Wahl der nukleosid-bildenden Einheiten entsteht ein Genchip mit einem bestimmten Oligonukleotidmuster.

Ein anderes Verfahren ist in der deutschen Offenlegungsschrift 195 43 232 beschrieben. Bei diesem Verfahren werden matrix-gebundene miniaturisierte Polymer- und Oligomerbibliotheken durch eine Mehrschrittsynthese hergestellt, indem ein mit einer Mikrostrukturierung versehener Stempel aus inertem Material auf ein Substrat aufgebracht wird, das eine Monoschicht aus einem Linker mit terminal geschützten funktionellen Gruppen trägt. Zuvor wird der Stempel in ein die terminalen Schutzgruppen befreies Reagenz getaucht, so daß im folgenden die so freigesetzten funktionellen Gruppen mit einem im weiteren hinzugefügten Monomer in einer Kettenverlängerungsreaktion reagieren können. Je nach Wahl der durch den Synthesealgorithmus vorbestimmten Mikrostrukturierung des Stempels und der eingesetzten Monomere können in diesem Verfahren Nukleinsäuren, Peptide, Polysaccharide und andere chemische Verbindungen synthetisiert werden.

Herkömmlicherweise werden auf einen Genchip bekannte Nukleotidsequenzen aufgebracht. Besonders bedeutsam sind dabei genspezifische Chips, wie z. B. ein Chip mit dem "Brustkrebsgen" BRCA-1 oder dem Gen für das Cytochrome p450, um einen bekannten genetischen Defekt zu diagnostizieren oder eine Krankheitsdisposition abzuschätzen.

Die Verwendung der Genchips in dieser Form der Diagnostik und Prediktion ist begrenzt, da dafür die Kenntnis der krankheitsrelevanten spezifischen Nukleinsäuresequenzen erforderlich ist. Bisher ist aber nur eine geringer Teil der genetischen Information vieler Organismen sequenziert und einer Funktion zugeordnet.

Die US-Patentschrift 5 837 832 enthält Überlegungen zu einem Genchip, der neben bekannten Sequenzen auch sog. kombinatorische Sequenzen (auch Oligonukleotid- oder Nukleinsäurekombination) aus acht Basenpaaren tragen

kann. Dabei sind diese Sequenzen dadurch definiert, daß sie theoretisch als Kombinationsmöglichkeiten der vier Ausgangsbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin und deren Analoga bestimmt sind. Sie sind nicht experimentell ermittelt. Auch ist die Funktion, Regulation oder Lokalisation dieser Sequenzen im Genom eines Organismus in der Regel unbekannt. Dennoch stellen die Hybridisierungsversuche mit diesen Nukleinsäurekombinationen beispielsweise bei der vergleichenden Analyse von Genomen und Expressionsmustern, der Untersuchung von Polymorphismen oder Mutationen ein geeignetes und wichtiges Instrument dar. Der besondere Vorteil kombinatorischer Sequenzen besteht zudem in ihrer Universalität, da sie für alle Lebewesen gleichermaßen zu verwenden sind.

Die in der US-Patentschrift 5 837 832 theoretisch offebarten kombinatorischen Oktamere haben jedoch in der Praxis eine nur geringe Bedeutung, da ihre Länge nicht ausreicht, um eine stabile Bindung mit einer komplementären zweiten Nukleinsäure zu gewährleisten. Ist die Bindung nicht ausreichend stabil, ist die Sequenz-Spezifität der Hybridisierungsreaktion zu gering. Dabei wird hier unter Sequenz-Spezifität das Hybridisieren mit einer bestimmten Sequenz und damit der Nachweis einer bestimmten Basenfolge verstanden. Für eine ausreichend stabile Hybridisierung ist bekanntermaßen eine Bindung über einen Bereich von etwa 18 Basenpaaren erforderlich. Die Anzahl aller Kombinationsmöglichkeiten einer 18 bp langen Sequenz von vier Basen liegt aber bei 4^{18} und übersteigt damit um Größenordnungen den auf einem Chip zur Verfügung stehenden Raum. Somit muß eine kombinatorische Sequenz lang genug sein, um eine stabile Bindung zu gewährleisten, aber auch kurz genug, um alle ihre Kombinationsmöglichkeiten auf einem Genchip Platz finden zu lassen.

Ein weiteres Problem liegt in der mangelnden Gen-Spezifität eines nur wenige bp langen Oligonukleotids. Dabei wird unter der Gen-Spezifität das Hybridisieren mit einer bestimmten Sequenz auf einem Gen oder nur wenigen Genen und damit der Nachweis dieses Gens bzw. dieser Gene verstanden. Analoges gilt für die Spezifität des Nachweises bestimmter mRNA-Spezies. Dies soll anhand einer Oligonukleotikombination aus neun Basen am Beispiel des Menschen erläutert werden:

Auf einer Strecke von neun Basen sind $4^9 = 262\,144$ (zur Vereinfachung etwa 300 000) verschiedene Kombinationen möglich. Die Länge des kodierenden Anteils des menschlichen Genoms liegt etwa bei $3 \cdot 10^7$ bis $3 \cdot 10^8$ Basen. Diese verteilen sich auf etwa 50 000 mRNA-Spezies. Rechnerisch kommt jedes dieser 300 000 Nonamer folglich zwischen 100- und 1000-mal in den mRNA-Molekülen des Menschen vor. Hieraus ergibt sich, daß jedes Nonamer theoretisch an etwa 500 bis 5000 verschiedene mRNA-Spezies binden kann. Diese Anzahl ist jedoch zu groß, um die Quantifizierung einzelner mRNA-Spezies und somit sinnvolle Schlußfolgerungen aus einem Hybridisierungsversuch zu erlauben.

Der Erfahrung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Oligonukleotikombination bereitzustellen, die eine definierte Hybridisierung mit einer komplementären Nukleotidsequenz ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst mit einer Nukleinsäurekombination, die eine n-mere Sequenz und mindestens zu einer Referenzsequenz komplementären Sequenz umfaßt.

Dabei handelt es sich bei einer Referenzsequenz um eine bekannte Sequenz. Die Oligonukleotikombination ist definiert als eine beliebige Folge von Nukleotiden, die sich als Kombinationsmöglichkeit der Ausgangsbasen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin, auch deren Derivate oder Analoga können enthalten sein. Auch können synthetische Purine oder Pyrimidine verwendet werden.

Durch die Verlängerung der kombinatorischen Oligonukleotide mit einer zu einer Referenzsequenz komplementären Sequenz wird die jeweilige Basenpaarung stabilisiert. Da alle Sequenzkombinationen an nur eine zu einer Referenzsequenz komplementären Sequenz gekoppelt sind, nimmt die Anzahl der potentiellen Kombinationen eines gewählten n-Mers trotz der Erhöhung der Sequenz-Spezifität nicht zu, so daß die Schwierigkeiten im Zusammenhang mit dem limitierten Raum auf einem Genchip vermieden werden.

Das verlängerte Oligonukleotid wird ferner nur an Targetsequenzen der Nukleotide binden, die sowohl zu der kombinatorischen Sequenz als auch zu der zu der Referenzsequenz komplementär Sequenz komplementär sind (siehe Fig. 1).

- 15 Die Referenzsequenz kann jede von dem Anwender vorgegebene Länge und Zusammensetzung aufweisen. Für die errechneten humanen 500 bis 5000 mRNA-Spezies, die als Bindungspartner eines einzigen kombinatorischen Nonamers potentiell in Frage kommen, reduziert sich damit die
- 20 Anzahl tatsächlicher Targetsequenzen erheblich. Die Kopplung eines kombinatorischen Oligonukleotids an eine zu einer Referenzsequenz komplementären Sequenz bedeutet somit auch eine Erhöhung nicht nur der Sequenz- sondern auch der Genspezifität der Oligonukleotid-Sonde. Diese reicht bereits bei kurzen n-Meren aus, z. B. bei Genexpressionsanalysen, die differentiell exprimierten Gensequenzen anhand der Sequenz auf dem Chip identifizieren und daher sequenzieren zu können. Dies ist aber nur möglich, wenn die Zahl der zu sequenzierenden Nukleinsäuren durch die Verwendung des erfundungsgemäßen Oligonukleotids überschaubar wird (z. B. weniger als 50).

Die Referenzsequenz eines Nonamers kann beispielsweise von einer oligo(dA)-Sequenz gebildet werden (siehe Fig. 2). Es ist bekannt, daß die mRNA-Moleküle aller eukaryontischen Organismen an ihrem 3'-Ende eine Sequenz von mindestens 10 Adeninresten tragen. Die Kopplung einer oligo(dA)-Sequenz mit einem kombinatorischen Nonamer erlaubt somit eine stabile Hybridisierung mit mRNA-Molekülen. Außerdem kann die Hybridisierung nur mit mRNA-Spezies erfolgen, die in Nachbarschaft zu der PolyA-Sequenz ein komplementäres Nonamer tragen. Das Vorkommen eines bestimmten Nonamers in Nachbarschaft zur PolyA-Sequenz liegt schätzungsweise um zwei Größenordnungen niedriger als die absolute Häufigkeit dieses Nonamers in der gesamten mRNA einer eukaryontischen Zelle. Somit erhöht die Kopplung an eine PolyT-Sequenz die Gen-Spezifität des kombinatorischen Oligonukleotids.

Die Verlängerung kombinatorischer n-Mere mittels Sequenzen, die zu anderen Referenzsequenzen komplementär sind, ist ebenfalls möglich. Nukleinsäuren können in Standardverfahren mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, so daß Fragmente mit der Erkennungssequenz des verwendeten Restriktionsenzymes entstehen. Erfundungsgemäß kann diese Erkennungssequenz als Referenzsequenz dienen, und eine dazu komplementäre Sequenz auf einen Träger aufgebracht werden. So wird diese Sonde nur mit den n-Meren der Targetsequenz hybridisieren, die zu der Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzymes benachbart liegen. Diese können im weiteren detektiert und quantifiziert werden.

Ebenso ist nach dem gleichen Prinzip die Verwendung beliebig anderer Referenzsequenzen, z. B. auch willkürlich ausgewählter Sequenzen oder konservierter Sequenzen, wie z. B. Polyadenylierungssignale oder die Kozak-Sequenz (siehe Fig. 3) möglich. Beiliegige Mischungen verschiedener Referenzsequenzen können für entsprechende Problemstellungen ebenfalls verwendet werden (siehe Fig. 4). Die Gen-Spezifität dieser Sonde ist dann nochmals erhöht. Die Erhö-

hung der Gen-Spezifität läßt sich allerdings schon allein durch die Kopplung der kombinatorischen Oligonukleotide an eine oder zwei bestimmte Basen erreichen.

Ein Genchip mit den erfundengenäßen Nukleotidsequenzen hat vielfache Verwendungsmöglichkeiten. So kann er z. B. in der vergleichenden Genomanalyse, der Untersuchung von Genexpressionen oder bei dem DNA-Fingerprinting eingesetzt werden.

Die erfundengenäße Nukleinsäurekombination kann beispielsweise an Träger aus mit Gold beschichtetem Glas aufgebracht werden. Das Trägermaterial kann auch aus Polystyrol- oder Latexkügelchen bestehen, die einen Eisenkern aufweisen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand verschiedener Ausführungsbeispiele erläutert.

Beispiel 1

Kopplung einer OligoT-Sequenz an ein kombinatorisches Nonamer

Vorbereitung des Trägers

Die mit einer OligoT-Sequenz gekoppelten kombinatorischen Oligonukleotide werden mit Hilfe von Standardtechniken (DE 196 12 356; US 5 837 832) auf einen geeigneten Träger aus mit Gold beschichtetem Glas aufgebracht. Dabei ist der Träger in quadratische Felder mit einer Kantenlänge von 500 µm eingeteilt. Die Oligonukleotidsäulen werden so auf dem Träger aufgebracht, daß sich auf den einzelnen Feldern jeweils nur eine Variante der Oligonukleotide befindet. Bei einem Nonamer ergeben sich $4^9 = 262\,144$ Felder, wobei z. B. das Feld 1,1 eine Nukleinsäure der Sequenz T_nACGTGTACT, das Feld 1,2 mit der Sequenz T_nACGTGTACA etc. trägt. T_n steht dabei für die gekoppelte konstante Sequenz. Somit befindet sich auf jedem der Felder des Trägers jeweils ein Nonamer mit der allgemeinen Formel T_nX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ (X_n ist dabei ein beliebiger Baustein der Nukleinsäuren, Adenin, Guanin, Cytosin, Thymidin).

Vorbereitung der Sondenlösung

Aus eukaryotischen Zellen oder Geweben wird mit Hilfe von Standardverfahren die polyadenyierte mRNA durch Bindung an eine oligoT-Matrix isoliert. Mit Hilfe eines oligoT-Primers, der mit einer T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz verknüpft ist, werden aus der RNA die repräsentativen cDNA-Moleküle durch reverse Transkription hergestellt. Durch eine in-vitro-Transkription mit einer T7-RNA-Polymerase werden aus den cDNA-Molekülen in Gegenwart eines biotinmarkierten Nukleosidtriphosphats cRNA-Moleküle synthetisiert. Die so erhaltenen biotinmarkierten cRNA-Moleküle werden in einem Hybridisierungspuffer (0,5 M NaPhosphat; pH 7,2; 7% Natriumlaurylsulfat; 0,5% Rinderserum-Albumin; 1 mM EDTA) aufgenommen.

Hybridisierung

Der Träger wird mit der Hybridisierungslösung überschichtet und bei 42°C inkubiert. Nicht gebundene Nukleinsäuren der Sondenlösung werden durch mehrmaliges Waschen mit einer auf 50°C vorgewärmten Waschlösung (0,1 M (Na-)Phosphat, pH 7,2, 1% Natriumlaurylsulfat, 1 mM EDTA) entfernt.

5 Die gewaschenen Träger werden für 10 min bei 25°C mit einer Lösung eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats inkubiert und danach mehrfach bei 25°C und 30°C gewaschen. Die Detektion erfolgt über Messung der Fluoreszenz-emission nach Anregung des Phycoerythrins durch einen geeigneten Laser und ein geeignetes Detektionssystem.

Beispiel 2

Kopplung einer zu der Sau 3Al Erkennungssequenz komplementären Sequenz an ein kombinatorisches Nonamer

15 Bei der Vorbereitung des Trägers wird eine zu der Erkennungssequenz des Restriktionsenzymis Sau 3Al komplementäre Sequenz an das kombinatorische Nonamer gekoppelt.

Nach der Synthese der cDNA-Moleküle durch reverse Transkription mit einem einfachen oligoT-Primer und in Gegenwart eines biotinmarkierten Nukleosidtriphosphats wird die RNA nach dem Stand der Technik mit RNase verdaut. Die so erhaltenen einzelsträngigen, repräsentativen biotinmarkierten DNA-Moleküle werden mit dem Restriktionsenzym Sau 3Al (Erkennungsequenz GATC, Spaltung der Nukleinsäure vor dem 5'-Ende) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anstelle der markierten cRNA aus Beispiel 1 wird die markierte restriktionsverdaute DNA in den Hybridisierungspuffer gegeben.

Beispiel 3

Kopplung eines Polyadenylierungssignals an ein kombinatorisches Nonamer

35 In Abweichung zu Beispiel 1 werden folgende Änderungen vorgenommen:

Als zu der Referenzsequenz komplementäre Sequenz wird die konservierte Sequenz des Polyadenylierungssignals an das nonamere Oligonukleotid gekoppelt. Die RNA wird mit Hilfe eines Primers der Art X₁X₂X₃X₄TATT in Gegenwart eines biotinmarkierten Nukleosidtriphosphats in die repräsentative cDNA umgeschrieben. Die markierte cDNA wird als Sonde in der Hybridisierungslösung eingesetzt.

Fig. 1 Prinzip des Genchips mit einem durch eine Referenzsequenz verlängerten Oligonukleotid am Beispiel eines Nonamers.

Die Abbildung zeigt das allgemeine Prinzip einer auf einen Träger aufgebrachten Zusammensetzung aus einer zu einer Referenzsequenz komplementären Sequenz und einer kombinatorischen Nukleotidsequenz. Hier wird ein kombinatorisches Nonamer dargestellt – aber auch andere Längen sind denkbar. Die Referenzsequenz kann prinzipiell jede vom Anwender vorgegebene Zusammensetzung und Länge haben. In der Regel wird es sich dabei um konservierte, häufig vorkommende oder in jeder DNA bzw. RNA vorhandene Sequenzen handeln. Die Anwendung des Chips beruht auf Hybridisierung der auf dem Träger aufgebrachten Oligomere mit isolierten, synthetischen oder amplifizierten Nukleinsäuren. Bei diesem Vorgang hybridisieren die komplementären Sequenzen der Nukleinsäuren spezifisch mit den Oligomeren des Trägers. Die dazu notwendige Sequenz-Spezifität wird durch Kombination der Referenzsequenz und einer kombinatorischen Sequenz mit 4^9 möglichen Oligomerkombinationen erreicht.

Fig. 2 Beispiel eines Chips mit einem an eine OligoT-Sequenz gekoppelten kombinatorischen Oligonukleotid. Die Buchstaben stehen für die Basen der Nukleinsäuren (A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin und T = Thymidin, Xn =

beliebige Abfolge der Nukleinsäuresequenz der RNA). Ein
derartiger Chip kann zu Expressionsuntersuchungen ver-
wendet werden. Mit einer Kombination der oligomeren, va-
riablen Nonamersequenz und einer decameren oligo(T)-Se-
quenz ist eine spezifische Hybridisierung mit cDNAs bzw.
amplifizierten cDNAs möglich. Die 4⁹ möglichen Varianten
der kombinatorischen nonameren Sequenz erlauben das Er-
fassen und Quantifizieren des gesamten exprimierten Gen-
Pools einer Zelle ohne die Kenntnis der Gensequenzen. Im
Anschluß an derartige Versuche ist eine Sequenzierung un-
bekannter RNAs mit Hilfe der kombinierten Oligomeren als
Sequenzierprimer möglich.

Fig. 3 Genchip mit einem an einer zu der Kozak-Sequenz
als Referenzsequenz komplementären Sequenz gekoppel-
tem nonamerem kombinatorischen Oligonukleotid.

Fig. 4 Allgemeines Beispiel einer Kopplung von zwei zu
verschiedenen Referenzsequenzen komplementären Sequen-
zen an eine kombinatorische Oligonukleotidsequenz.

Patentansprüche

20

1. Nukleinsäurekombination mit Sequenzen, die eine n-Mere und eine zu mindestens einer Referenzsequenz komplementären Sequenz enthalten.
2. Nukleinsäurekombination nach Anspruch 1, ge- 25 kennzeichnet durch eine nonameren kombinatorische Nukleotidsequenz.
3. Nukleinsäurekombination nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren an ei- 30 nen Träger gebunden sind.
4. Nukleinsäurekombination nach Anspruch 3, da- durch gekennzeichnet, daß der Träger aus mit Gold be- schichtetem Glas besteht.
5. Nukleinsäurekombination nach Anspruch 3, da- 35 durch gekennzeichnet, daß der Träger aus Polystyrol besteht.
6. Nukleinsäurekombination nach Anspruch 3, da- durch gekennzeichnet, daß der Träger aus Latex be- steht.
7. Nukleinsäurekombination nach einem der Ansprü- 40 che 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenz- sequenz die Kozak-Sequenz umfaßt.
8. Nukleinsäurekombination nach einem der Ansprü- che 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenz- 45 sequenz eine Plasmidsequenz umfaßt.
9. Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Nuklein- säuren mit einer komplementären Nukleinsäurekombi- nation hybridisiert werden, die eine zu mindestens ei- 50 ner Referenzsequenz komplementäre Sequenz umfaßt.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

Fig. 1

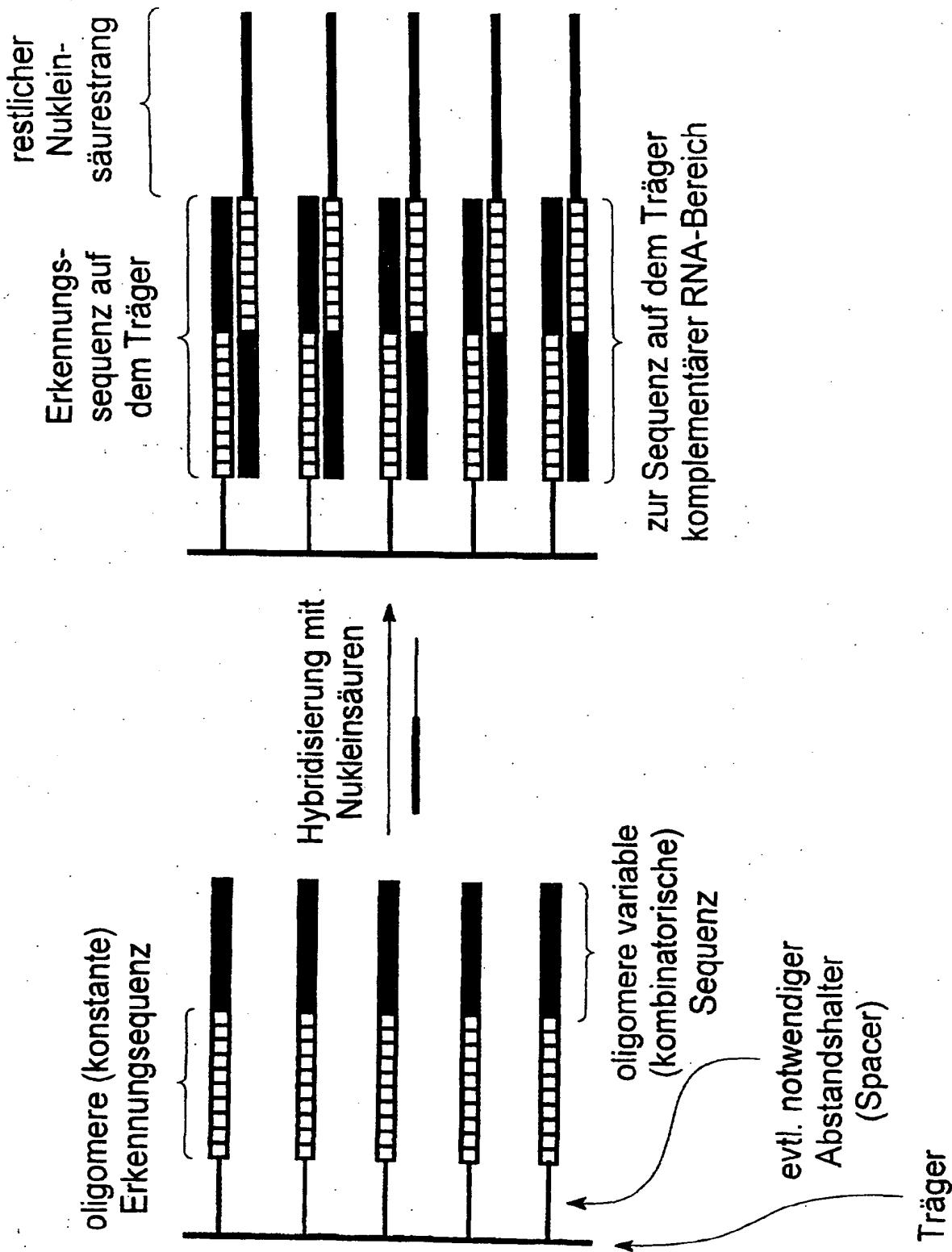
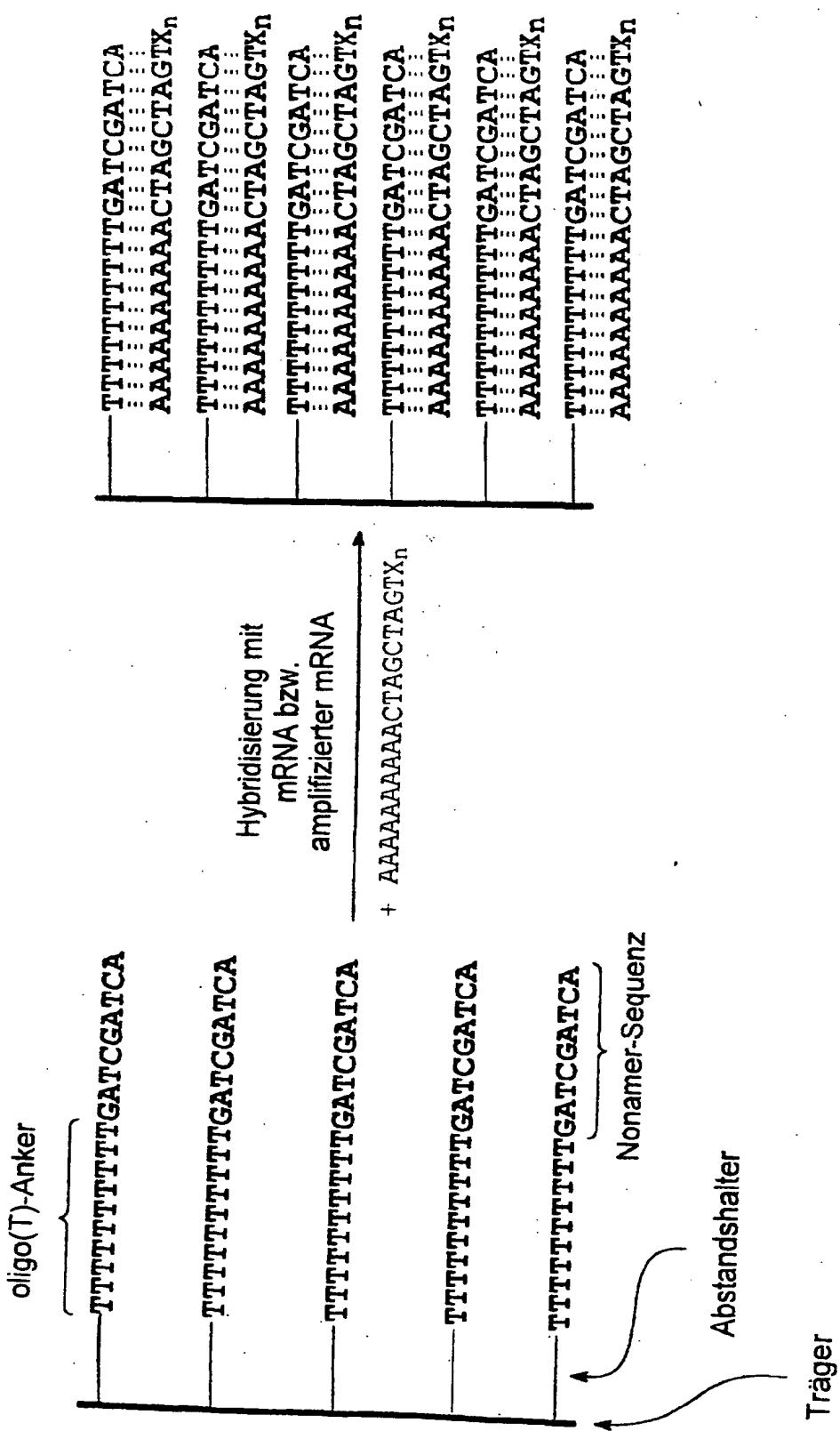


Fig. 2



३
तीर्थ

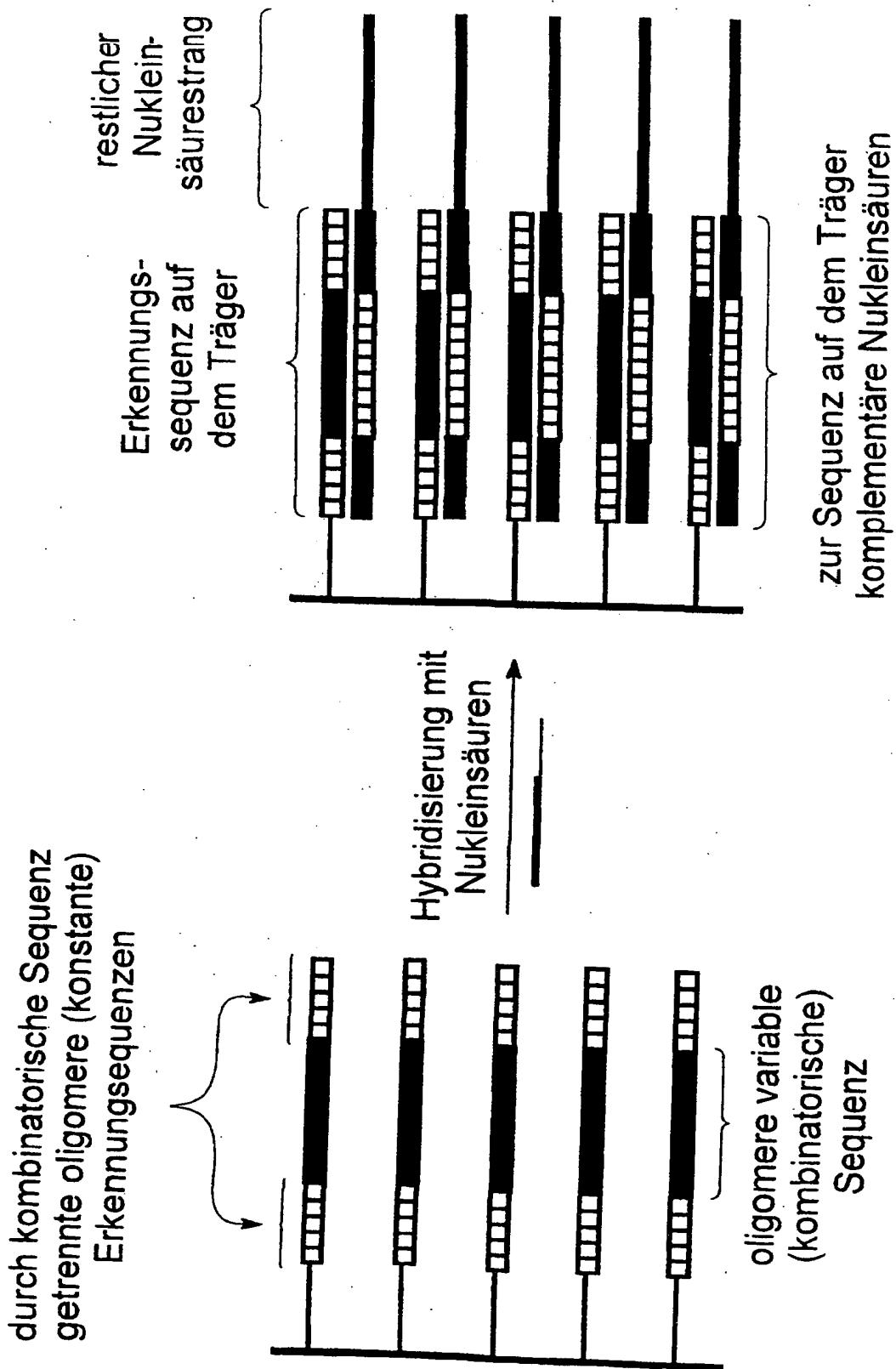


Fig. 4